Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. Hans Joachim Dulce

Der Einfluß von Gallensäuren und Lezithin auf die Kristallisation von Cholesterin

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tronje Gramsdorff
aus Grünheide/Mark

1976

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. Hans Joachim Dulce

Der Einfluß von Gallensäuren und Lezithin auf die Kristallisation von Cholesterin

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tronje Gramsdorff
aus Grünheide/Mark

Referent: Prof. Dr. med. H.J. Dulce

Korreferent: Prof. Dr. med. F. von Bruchhausen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität

Promoviert am: 7.8.1976

Inhaltsverzeichnis

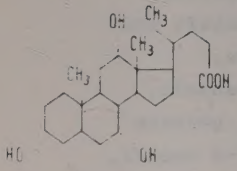
		Seite
I.	Einleitung	3
II.	Fragestellung	15
III.	Methodik	16
IV.	Diskussion	26
V.	Zusammenfassung	31
VI.	Literaturverzeichnis	33

I. Einleitung

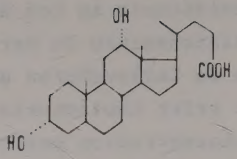
Cholesterin ist eine wasserunlösliche, aber in Alkohol gut lösliche Verbindung. Es entsteht durch Biosynthese hauptsächlich in der Leber und im Bindegewebe aus einer aliphatischen Kohlenwasserstoffkette, die letztlich durch Kondensationsreaktionen aus dem Acetylcoenzym A gebildet wird. Die Leber scheidet Cholesterin in den Gallensaft und in das Plasma aus und ist gleichzeitig in der Lage, Cholesterin durch Oxydation in Gallensäuren umzuwandeln. Im Plasma und im Gallensaft tritt Cholesterin als gelöste Verbindung auf. Die Plasmakonzentration beträgt 3-8 mmol/l, die Konzentration in der Lebergalle 2-5 mmol/l, die in der Blasengalle 11-23 mmol/l (Rauen, H.W. 1964). Seine Löslichkeit im Plasma wird durch Veresterung ermöglicht, seine Löslichkeit im Gallensaft wird der gleichzeitigen Anwesenheit von Gallensäuren und Lezithin zugeschrieben. Unter Krankheitsbedingungen kommt es im Gallensaft zur Auskristallisation von Cholesterin und damit zur Gallensteinbildung. Gallensteine bestehen hauptsächlich aus Cholesterin, wenn man von einem geringen Prozentsatz an sogenannten Bilirubinhaltigen Pigmentsteinen absieht.

Die Gallensäuren sind Oxydationsprodukte des Cholesterins. Der Steranring kann in den Positionen 3,7,12 hydroxyliert werden, nachdem die Seitenkette endständig zur Carboxylgruppe oxydiert wurde. So entstehen die in der menschlichen Galle überwiegend vertretenen Gallensäuren als Mono-, Di- und Trihydroxycholansäuren (Abb. 1).

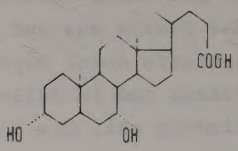
Abb. 1 Chemische Struktur der wichtigsten biologischen Gallensäuren.



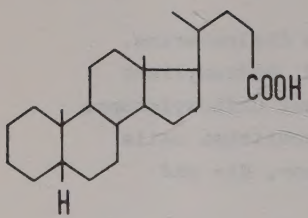
Cholsäure



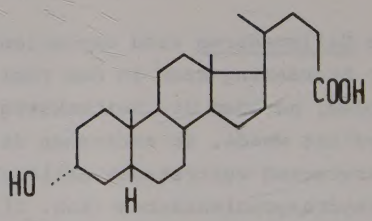
Desoxycholsäure



Chenodesoxycholsäure



Cholansäure

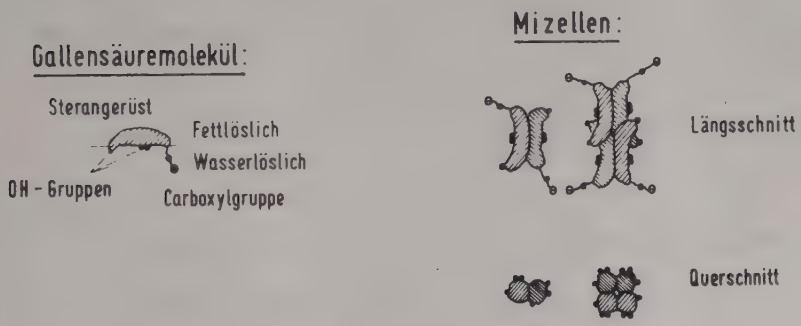


Lithocholsäure

Diese Gallensäuren werden durch die Leber zusätzlich säureamidartig mit Glycin und Taurin konjugiert und dann in den Gallensaft ausgeschieden. Damit wird eine verbesserte Löslichkeit der als solche in Wasser ebenfalls schwer löslichen Gallensäuren erreicht. Ihre Konzentration in der Lebergalle beträgt 16-33 mmol/l, in der Blasengalle 100-273 mmol/l (Rauen, H.W. 1964). Im Darm wird die Chenodesoxycholsäure teilweise zu Lithocholsäure und die Cholsäure zu Desoxycholsäure reduziert, die miteinander resorbiert und im Gallensaft als Konjugate wieder ausgeschieden werden. Sie unterliegen damit einem entero-hepatischen Kreislauf. Die in diesem Kreislauf bewegte Gallensäuremenge wird als Pool bezeichnet.

Die Gallensäuren sind als Na-Salze im schwach basischen pH-Bereich am besten löslich. Dann sind die Gallensäuren dissoziiert und bilden aus monomeren Molekülen Makromoleküle, sogenannte lösliche Micellen (Small, D.M. 1968a, 1969). Dabei lagern sich 2-8 Monomere mit ihrem hydrophoben Steranring zusammen, sodaß die hydrophilen OH-Gruppen und die Carboxyl- oder SO_3H-Gruppen nach außen zu liegen kommen (Abb. 2).

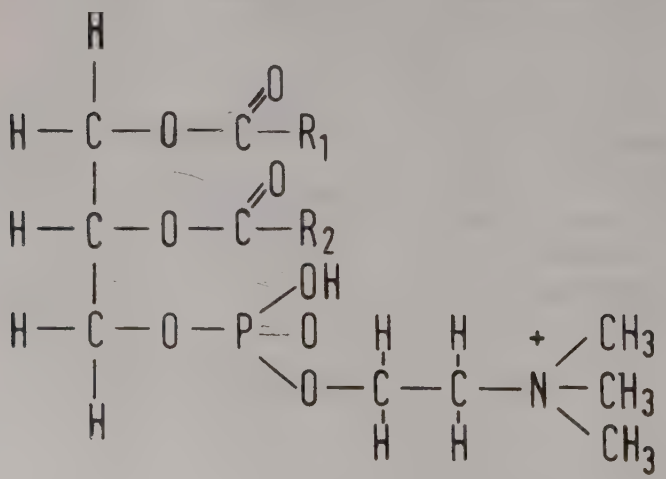
Abb. 2 Mizellare Struktur der Gallensäuren
nach SMALL, D.M. 1968a, 1969



Es besteht in der Lösung ein Gleichgewicht zwischen monomeren und mizellaren Lösungsanteilen der Gallensäuren. Bei geringen Konzentrationen bilden die einzelnen Gallensäuren kleine Mizellen, bestehend aus 2-8 Molekülen (sog. primary micelles). Die Größe der Mizellen, die durch Cholsäure als Trihydroxy-Gallensäure gebildet werden, bleibt bei erhöhter Fremdionenkonzentration konstant. Demgegenüber nehmen die durch die Dihydroxy-Gallensäuren, Chenodesoxycholsäure und Desoxycholsäure,gebildeten Mizellen bei einer Erhöhung der Fremdionenkonzentration an Umfang bis zu 2o Molekülen zu (sog. secundary micelles).
Die Größe der Mizellenbildung kann nach SMALL, PENKETT und CHAPMAN (1969) zusätzlich von den Parametern, Temperatur, pH-Wert und Harnstoffkonzentration abhängig sein.

Lezithin ist ein an sich wasserunlösliches Phosphatid mit einem etwas variablen Fettsäureanteil, das unter anderem von der Leber synthetisiert und in größeren Mengen in den Gallensaft sezerniert wird (Abb. 3).

Abb. 3 Chemische Struktur des Lezithins.



Lezithin ist in der Lage, unter Wasseraufnahme an die hydrophilen, polaren Gruppen in eine flüssig-kristalline Phase überzugehen. Dabei entstehen kubische oder lamelläre, emulgierbare Kristalle. Die Lezithinkonzentration in der Lebergalle beträgt 1,3 - 7,7 mmol/l und in der Blasengalle lo-46 mmol/l (Rauen, H.W. 1964, Greif, S. 1975, Fitzner, R. 1976).

Gallensäuren und Lezithin werden für die Löslichkeit des Cholesterins im Gallensaft verantwortlich gemacht. Invitro-Bestimmungen der Löslichkeit von Cholesterin in verschiedenen Gallensäurelösungen wurden von BOURGES u.M. (1969) und SMALL (1968) durchgeführt. Mischungen von Taurin- und Glycin- konjugierten Di- und Trihydroxy-Gallensäuren, wie sie im menschlichen Gallensaft vorkommen, vermochten lediglich ein Drittel der normalerweise im menschlichen Gallensaft vorhandenen gelösten Cholesterinmenge in Lösung zu halten. Die Lösung zeigte eine reine flüssig-mizellare Phase.

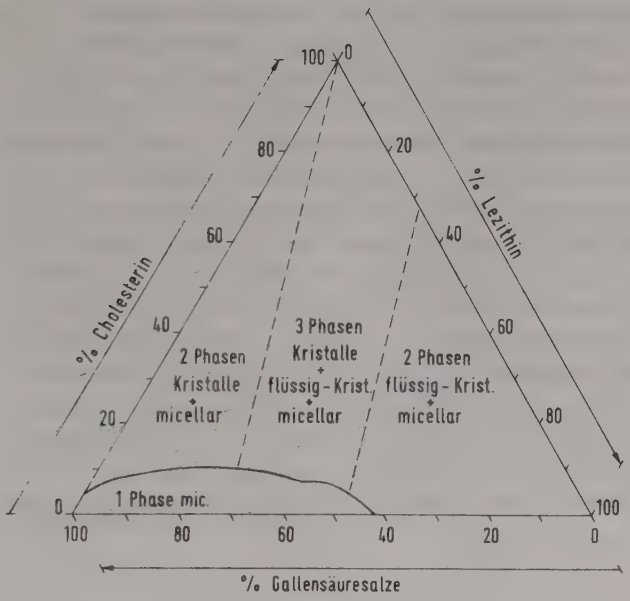
Weiterhin bestimmten BOURGES (1967a) und SMALL (1966) den Einfluß des Lezithins auf die Cholesterinlöslichkeit. Es zeigte sich, daß Lezithin-Cholesterin-Wassergemische eine lamelläre, flüssig-kristalline Phase bilden, in der Cholesterinmoleküle im Verhältnis 1 mol Lezithin / 1 mol Cholesterin interlamellär gelöst waren. Es fand sich jedoch keine flüssig-mizellare Phase.

Ferner bestimmten SMALL u.M. (1966, 1966a) den Einfluß von Gallensäuren auf die Lezithin-Löslichkeit. Bei Gallensäuren-Lezithin-Wassergemischen werden 3-flüssig-kristalline Phasen gebildet: 1. eine lamelläre, flüssig-kristalline Phase bei niedriger Gallensäuresalzkonzentration und hoher Lezithinkonzentration; 2. eine hexagonale, flüssig-kristalline Phase bei höherer Gallensäuresalzkonzentration und 3. eine flüssig-mizellare Phase, bei der 1mol Gallensäuresalz 2mol Lezithin in Lösung hielten.
Als Meßmethoden bei diesen Untersuchungen wurden light-scattering, Ultrazentrifugation, Bestimmungen der Viscosität, Röntgenbeugung, Oberflächenspannung und Nuclear Magnetischer Resonanz verwendet.

Schließlich ermittelte man den kombinierten Einfluß von Gallensäuren und Lezithin auf die Cholesterinlöslichkeit in Wasser.

W.H. ADMIRAND und D.M. SMALL (1968) konnten anhand ihrer Invitro-Versuche ein dreieckiges Diagramm aufstellen, welches anschaulich die Löslichkeitsverhältnisse von Cholesterin in Abhängigkeit von zu- bzw. abnehmenden Gallensäure- und Lezithinmengen darstellt. Die festen Substanzen betrugen insgesamt 1o%, der Wasseranteil betrug konstant 9o%. Sie ermittelten eine sogenannte Sättigungslinie, oberhalb derer es zu einer Auskristallisation von Cholesterin kam. Gleichzeitig wurden drei verschiedene Lösungs-Phasen abgeleitet: 1. kristallin, 2. flüssigkristallin, 3. mizellar. Unterhalb der Sättigungslinie fanden sich in der ausschließlich mizellaren Phase keine Cholesterin-Kristalle (Abb. 4).

Abb. 4 Lösungsphasen im System Cholesterin-Lezithin-Gallensäure-Wasser nach ADMIRAND und SMALL (1968)



F.G. HEGARDT und H. DAM (197o) untersuchten als erste getrennt die Wirksamkeit der einzelnen physiologisch vorkommenden Gallensäuresalze unter Zusatz von steigenden Lezithinmengen auf die Auflösung von Cholesterin-Kristallen. Sie gingen dabei von loo millimolaren Lösungen der Gallensäuren aus und fügten chromatographisch gereinigtes Eilezithin in Mengen von Null bis ungefähr 8o mmol pro loo mmol Gallensäuresalz hinzu.Um ein mmol Cholesterin in Abwesenheit von Lezithin in Lösung zu halten, benötigten die Autoren 19 mmol Glycodesoxycholat, 3o mmol Taurodesoxycholat, 34 mmol Glycochenodesoxycholat, 47 mmol Taurochenodesoxycholat, 52 mmol Glycocholat und 62 mmol Taurocholat. Die Desoxycholsäuren erwiesen sich hiernach als der wirksamste Lösungsvermittler für Cholesterin. Je mehr Lezithin den Ansätzen zugesetzt war, umso geringer wurden die Wirkungsunterschiede der Gallensäuren. Weiterhin ermittelten die Autoren, daß die Sättigungsgrenze für Cholesterin in einer loo millimolaren Lösung einer physiologischen Mischung der sechs Gallensäuresalze und Lezithin aus menschlicher Galle (Abb. 5) mit der Sättigungsgrenze für Cholesterin in einer loo millimolaren Lösung von Natrium-Glycochenodesoxycholat mit Zusatz von chromatographisch gereinigtem Eilezithin (Abb. 6) praktisch identisch ist. Leider gaben HEGARDT u.M. nicht die in ihren Versuchsansätzen im Überstand auftretenden absoluten Cholesterinkonzentrationen an.

Abb. 5 Löslichkeitsgrenze von Cholesterin in loo millimolarer wässriger Lösung der sechs physiologischen Gallensäuren im Verhältnis zu Lezithinzusätzen (Hegardt und Dam, 197o).

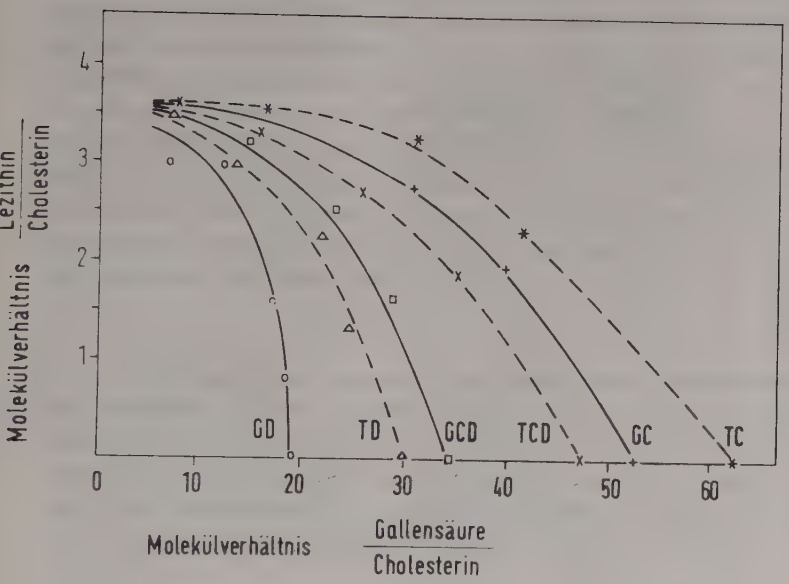
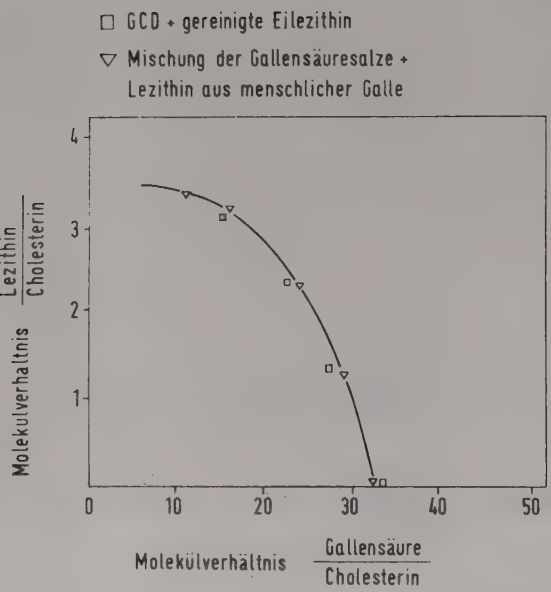


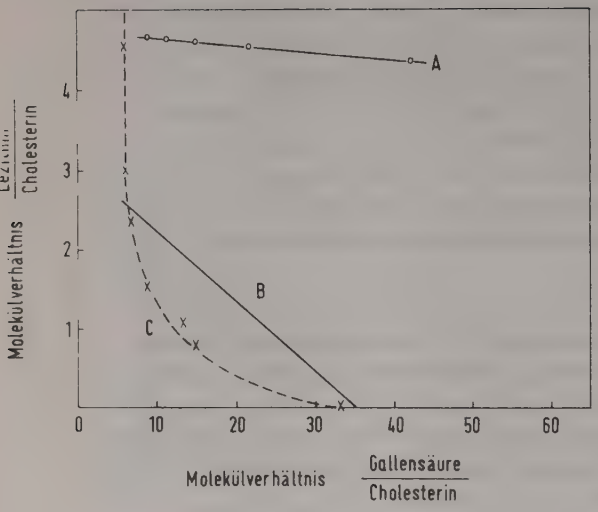
Abb. 6 Löslichkeitsgrenze von Cholesterin in loo millimolarer Lösung von Na-Glycochenodesoxycholat im Verhältnis zu Lezithinzusätzen (Hegardt und Dam, 197o).



NEIDERHISER und ROTH (1968) stellten bei ihren Untersuchungen eine etwas andere Rangfolge der Invitro-Wirksamkeit der Gallensäuren fest, und zwar: 1. Glycodesoxycholat (GD), 2. Taurodesoxycholat (TD), 3. Glycocholat (GC), 4. Glycochenodesoxycholat (GCD), 5. Taurocholat (TC), 6. Taurochenodesoxycholat (TCD). Übereinstimmend mit HEGARDT und DAM (197o) wurde die Glycodesoxycholsäure als wirksamste Gallensäure erkannt. Die Glycinkonjugierten Gallensäuren zeigten ein besseres Lösungsvermögen für Cholesterin als die Taurinkonjugierten, und eine Mischung der sechs Gallensäuren zeigte eine fast identische Lösungskapazität für Cholesterin wie die Glycochenodesoxycholsäure. NEIDERHISER und ROTH (1968) fanden außerdem, daß Lezithin konzentrationsabhängig in Gegenwart von Gallensäuren die Löslichkeit von Cholesterin steigert. HIGUCHI u.M. (1972) beobachteten dagegen, daß Lezithin in Gegenwart von Gallensäuren die Cholesterinlöslichkeit verschlechtert.

Bei einem graphischen Vergleich der Untersuchungsergebnisse von ADMIRAND und SMALL (1968), NEIDERHISER und ROTH (1968) sowie SAUNDERS und WELLS (1969), die mit einer 2o millimolaren Lösung des Glycocholates arbeiteten, zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen von HEGARDT und DAM (197o) (Abb. 7).

Abb. 7 Löslichkeitsgrenzen von Cholesterin in Gallensäure-Lezithin-Wasser-gemischen.



A = nach Ergebnissen von Saunders u. Wells

B = Neiderhiser u. Roth GCD

C = Admirand u. Small

Aus all diesen Beobachtungen ist abzuleiten, daß die Löslichkeitsverhältnisse von Cholesterin in Gallensäure-Lezithingemischen noch nicht abgeklärt sind.

Parallel zu diesen Invitro-Versuchen ermittelte man bei Gesunden und Gallensteinkranken die Zusammensetzung der Leber- und Blasengalle. ADMIRAND und SMALL (1968) entnahmen während chirurgischer Eingriffe bei Gesunden und Steinkranken Blasengalle und bestimmten quantitativ Cholesterin, Lezithin und Gallensäuren. Tabelle 1.

SMALL, SHAFFER und BRAASCH (1972) untersuchten ebenfalls operativ entnommene Leber- und Blasengalle von amerikanischen Indianern. Sie fanden bei Steinkranken im Gallensaft eine erniedrigte Lezithin- und Gallensäurekonzentration und, wenn Cholesterinkristalle auftraten, zusätzlich eine erhöhte Cholesterinkonzentration. Alle Steinkranken hatten eine Gallensaftzusammensetzung, die eine verringerte Gallensäurekonzentration und einen Cholesterinanstieg aufwies und entweder auf- oder oberhalb der sogenannten Sättigungslinie des Dreieck-Diagramms lag (Abb. 4).
Untersuchungen von THUREBORN (1962) bei Gallensteinkranken, bei denen der enterohepatische Kreislauf durch Ableitung der Lebergalle über ein T-Drain unterbrochen war, ergaben eine Zusammensetzung der Lebergalle, die eine niedrige Gallensäurekonzentration und eine hohe Cholesterinkonzentration hatte, d.h. übersättigt war.

Tabelle 1

Gallensaftzusammensetzung normaler Gallenblasen und von Gallenblasen mit Cholesterinsteinen.
(Admirand und Small, 1968)

	Konzentration in mmol/l		
	Gallensäuren	Lezithin	Cholesterin
Normaler Gallensaft Durchschnittswerte von 25 Fällen	135,2	38,o	11,1
Pathologischer Gallensaft ohne Cholesterinmikrokristalle Durchschnittswerte von 38 Fällen	87,9	15,9	11,o
Pathologischer Gallensaft mit Cholesterinmikrokristallen Durchschnittswerte von 28 Fällen	97,6	17,7	21,9

SMALLWOOD, JABLONSKI und WATTS (1972) dagegen ermittelten, daß nur 55% der Proben der Blasengalle und nur 59% der Proben der Lebergalle bei Cholesterinsteinträgern mit Cholesterin gesättigt bzw. übersättigt waren. Diese Autoren folgern, daß sowohl normal zusammengesetzte als auch übersättigte Lebergalle bei Steinträgern und auch Nichtsteinträgern auftreten kann.

BRÜHL (1972) bestimmte das Verhältnis Gallensäure- + Lezithin-Konzentration / Cholesterinkonzentration im Gallensaft von Verstorbenen und fand bei 13 Steinkranken einen mittleren Quotienten von 7,7 $\pm$ 2,o und bei 14 Gesunden einen mittleren Quotienten von 11,o $\pm$ 2,5. Diese Werte bestätigen, daß ein Teil der Gesunden möglicherweise einen Cholesterinübersättigten Gallensaft hat. Sie zeigen aber gleichzeitig, daß es bei Steinkranken im Rahmen ihrer Fälle keinen Gallensaft mit einem Quotienten über 1o,2, der in den mittleren Lösungsbereich der Gesunden reicht, gibt. BRÜHL (1972) fand weiterhin, daß die Abnahme der Phospholipid- und Trihydroxycholansäure-Konzentrationen zur Abnahme des Quotienten in dem Blasengallensaft von Steinkranken führt. Nach seinen Untersuchungen ist die Konzentration der Desoxycholsäuren im Gallensaft der Steinkranken nicht geringer als in dem der Gesunden.

In Verbindung mit den Invitro-Versuchen konnte aus diesen Befunden abgeleitet werden, daß die veränderten Sättigungsverhältnisse wahrscheinlich die Ursache der Steinbildung sind.

Es bleibt noch offen, ob die Lebergalle primär übersättigt ist, oder aber eine normale Lebergalle in der Gallenblase durch Vorgänge wie selektive Resorption oder Entzündung in eine übersättigte Cholesterinlösung übergeht.

Man kann die Invitro-Ergebnisse teilweise auf die biologischen Verhältnisse beim Tier übertragen. SHIODA (1965) und TANIMURA (1965) stellten fest, daß Hamster mit Cholesterinsteinen eine dem Gallensaft von menschlichen Steinträgern ähnliche Zusammensetzung der Leber- und Blasengalle haben. Dieser Gallensaft war mit Cholesterin stark übersättigt und die Konzentrationswerte lagen oberhalb der sogenannten Sättigungslinie (Abb. 4). Die Lebergalle wurde hierbei durch eine Gallenfistel mit völliger Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs gewonnen.

Untersuchungen von CALDWELL und LEVITSKY (1967) bei Mäusen mit Cholesterinsteinen zeigten, daß bei gleichzeitig entnommener Leber- und Blasengalle die Lebergalle zwar relativ höher mit Cholesterin gesättigt schien, jedoch die Konzentrationsverhältnisse noch unterhalb der sogenannten Sättigungsgrenze und damit in der Flüssig-mizellaren Zone lagen. Die Meßwerte in der Blasengalle lagen aber eindeutig oberhalb der Sättigungsgrenze, was für eine Übersättigung an Cholesterin sprach.

Versuche mit Affen (Dowling u.M. 1968), bei denen der enterohepatische Kreislauf unterbrochen war, zeigten, daß die Lebergalle in ihrer Zusammensetzung ständig

innerhalb der mizellaren Zone blieb. Bemerkenswert ist auch, daß Hunde keine Gallensteine bilden und eine sehr geringe Cholesterinkonzentration bei relativ hoher Gallensäure- und Lezithin-Konzentration im Gallensaft haben (Rauen, H.W. 1964).

Da die Cholesterinsteinbildung und Cholesterinlöslichkeit nach den in vitro und in vivo Beobachtungen von dem Umfang der Gallensäuresekretion in den Gallensaft abzuhängen scheint, sind in den letzten Jahren Therapieversuche bei Tieren und Menschen durchgeführt worden mit dem Ziel, durch Zufuhr von Gallensäuren die Gallensteinbildung zu hemmen oder vorhandene Gallensteine aufzulösen. So konnte DAM (1962, 1969) feststellen, daß Hamster bei Zusatz von Hyodesoxycholsäure, zu einer lithogenen Kost, signifikant weniger Gallensteine bilden, während Chenodesoxycholsäurezusätze die Steinhäufigkeit, wie auch DULCE (1975) in ähnlichen Versuchen bestätigen konnte, nicht beeinflußten.

DANZIGER (1972), FLÜGEL (1974), BELL (1972) und THISTLE (1973) haben durch orale Verabreichung von Chenodesoxycholsäure bei menschlichen Gallensteinträgern eine röntgenologisch belegbare Auflösung der Steine erreicht. Hierbei handelt es sich zwar um erfolgsversprechende Versuche zur Auflösung menschlicher Gallensteine, jedoch lassen sich diese klinischen Beobachtungen noch nicht mit klaren Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Chenodesoxycholsäure verbinden.

Teilweise fürchtet man sogar toxische Nebenwirkungen, weil aus Chenodesoxycholsäure Lithocholsäure im Darm reduktiv entsteht.
Die Deutung der Befunde von DANZIGER u.M. (1972) wird besonders schwierig, wenn man bedenkt, daß sich Gallensteine auch spontan auflösen können (Wolpers, C. 1968). Man nimmt an, daß Chenodesoxycholsäure in der Leber die Dihydroxydimethylglutaryl-Coenzym A-reduct se hemmt und dadurch die Cholesterinsyntheserate senkt (Schoenfield, L. 1973). Andererseits sind die Desoxycholsäuren im Gallensaft der Steinkranken nicht vermindert (Brühl, W. 1972).

II. Fragestellung

Bisher wurden in vitro Löslichkeitsstudien, die von kristallisiertem Cholesterin ausgehen, durchgeführt. Biologisch erfolgt aber die Kristallisation aus einer Lösung, die an Cholesterin übersättigt sein muß.
Es erhob sich deshalb die Frage, ob die Gallensäuren und das Lezithin auch bei der Kristallisation von Cholesterin aus Lösungen wirksam sind und welche Gallensäuren die besten Wirkungen als Lösungsvermittler entfalten.
Wir entwickelten deshalb ein Fällungsmodell fürCholesterin in wässrig-alkoholischer Lösung und untersuchten den Einfluß von verschiedenen Gallensäuresalzen und des Lezithins im Bereich biologischer Konzentrationen auf die Kristallisation von Cholesterin.

III. Methodik

a) Substanzen:	Molekulargewicht:	Hersteller:
Cholesterin	386,7	Merck p.A.
Lezithin Ei	ca. 75o	Merck
Na-Cholanat	43o,6	Krämer u.Märtin KG
Na-Lithocholat	398,6	Eigenherstellung[+)]
Na-Desoxycholat	416,6	Serva
Na-Glycodesoxycholat	471,6	Serva K u.K Laboratories
Na-Taurodesoxycholat	521,7	Calbiochem 58o221 Lot. 41oo59
Na-Chenodesoxycholat	414,6	Serva
Na-Glycochenodesoxycholat	471,6	Sigma No G 3oo3 Lot. 14 c 12oo
Na-Taurochenodesoxycholat	521,6	Sigma No T 5754 Lot. 34 c 253o2
Na-Cholat	382,6	Merck
Na-Glycocholat	487,6	Serva K u. K Laboratories
Na-Taurocholat	537,7	Merck
Na-Taurolithocholat	5o5,6	Fluka AG (CH 947o) Buchs SG

[+)] Fällung mit absolutem Alkohol aus einer Lösung von Lithocholsäure in 3 m NaOH. Nachwaschen mit Alkohol. Trocknen bei 1o5°C. Kontrolle des Na-Gehaltes flammenphotometrisch.

b) Verdünnungsreihen

alkohol. Cholesterinlösung in mmol/l

1,3 - 2,6 - 3,9 - 5,2 - 6,5 - 7,8 - 1o,4 - 13,o

wässrige Gallensäuresalzlösung in mmol/l

1o - 2o - 5o - 1oo - 15o - 2oo - 25o - 3oo - 4oo - 45o - 5oo - 9oo

wässrige Lezithinlösung in mmol/l

1o - 2o - 5o - 1oo - 15o - 2oo - 25o - 3oo - 4oo

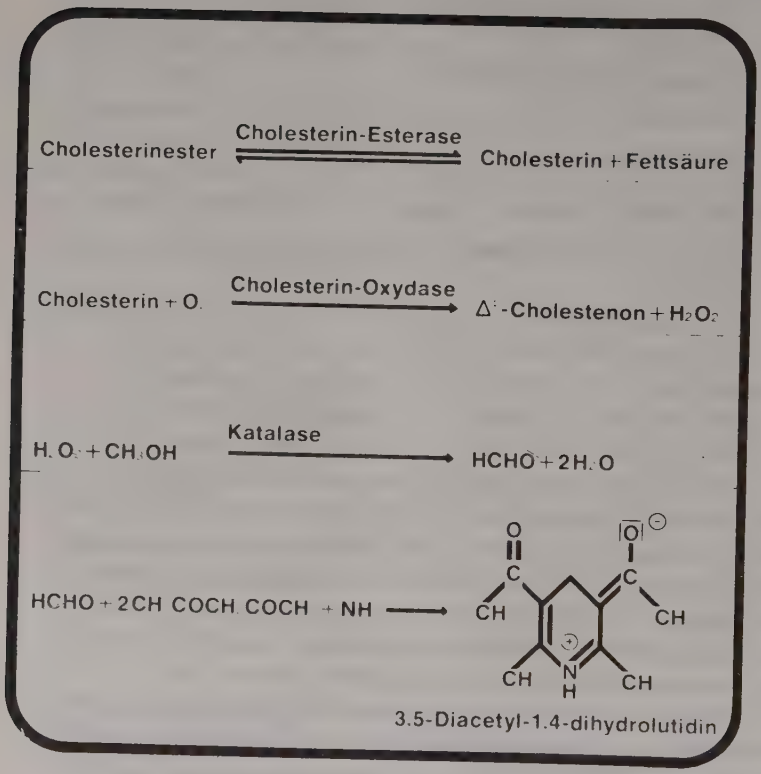
Reagenzien: Absol. Alkohol - Merck p.A. - Eisessig - Merck p.A

Enzymatischer Cholesterintest - Boehringer Mannheim Nr. 15732

c) Kristallisationsmodell

Ausgegangen wird von alkoholischer Cholesterinlösung in Konzentrationen von 1,3 mmol/l. Im Leerversuch werden 2 ml dieser Cholesterinlösung mit 1 ml aqua. dest. versetzt. Nach kräftigem Schütteln wird der Ansatz eine Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend 2o Minuten bei 3ooo U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Glaskapillare, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, sorgfältig abgesaugt und der Niederschlag in 2 ml Eisessig wieder gelöst. Die Bestimmung der in Eisessig gelösten Cholesterinmenge erfolgt enzymatisch mit dem Boehringer-Test. Prinzip dieses Testes ist, nach Hydrolyse der Ester, die enzymatische Oxydation von Cholesterin mit Hilfe von Cholesterinoxydase, die enzymatische Reduktion des gebildeten H_2O_2 durch Methanol, und die Bestimmung des entstandenen Formaldehyds über eine Kondensationsreaktion mit Acetylaceton und NH_3 (Abb. 8).

Abb. 8 Schema der Cholesterinoxydasereaktion.



Das Kondensat ist ein bei 4o5 nm photometrierbarer Farbstoff (Röschlau u.M. 1974).

Ansatzchema:	Leerwert	Probe
Probe	o,o2 ml	---
Lösung 5	5,o ml	---
	mischen	
Lösung 4	---	o,o2 ml
Vom Leerwert abpipettiert	---	2,5 ml
	mischen	

Leerwert und Probe werden eine Stunde bei 37° incubiert und anschließend die Extinktion der Probe gegen den Leerwert gemessen.
Aus den gemessenen Extinktionswerten errechneten wir durch Multiplikation mit dem Faktor 26,2 die mg Cholesterin in dem Ansatz. In den Tabellen werden die Mittelwerte von Doppelbestimmungen angegeben.
Meßwerte über o,5 mg Cholesterin pro Ansatz schwanken maximal bis ± 6% VK, meist nur ± 3% VK. Meßwerte unter o,5 mg Cholesterin pro Ansatz schwanken bis ± 15% VK, in Einzelfällen auch einmal um ± 2o% VK. Die häufigsten Basiswerte für Cholesterin im Fällungsmodell betrugen 1,17 ± o,o4 mg und 1,92 ± o,11 mg.

+VK = Variationskoeffizient

d) Versuchsreihen

Anstelle des aqua dest.-zusatzes wurde zu der alkoholischen Cholesterinlösung 1) 1 ml der verschieden molaren Lösungen der einzelnen Gallensäuresalze zugefügt, 2) 1 ml eines Gemisches aus o,5 ml einer Gallensäuresalz- und o,5 ml einer Lezithinlösung zugesetzt. Teilweise enthielten die Zusätze aequimolare Anteile von Lezithin und Gallensäuren, teilweise auch zunehmende Mengen von Lezithin bei konstanten Gallensäurekonzentrationen oder konstante Lezithinmengen bei zunehmenden Gallensäurekonzentrationen.

e) Beurteilung der Meßdaten

Wir beurteilten die kristallisationshemmende Wirkung der Zusätze in % der Basiswerte in aqua dest. Die Modellfällung von Cholesterin liegt in der gesamten Konzentrationsreihe ca. 3o-4o% unter dem theoretischen Cholesteringehalt des Ansatzes (Tab. 2).

Tab. 2 Cholesterinkristallisation im System Alkohol / Wasser

Cholesterin-Konzentration im Ansatz. mmol/l	mg theoretische Cholesterinmenge im Ansatz.	mg kristallisiertes Cholesterin im Ansatz.
o,87	1 mg	o,38
1,74	2 mg	1,17
2,61	3 mg	1,92
3,48	4 mg	2,83
4,35	5 mg	3,42
5,22	6 mg	4,o8
6,96	8 mg	5,67
8,71	lo mg	7,28

Mischung: 2 ml alkohol Cholesterinlösung.
1,3 - 13 mmol/l
1 ml aqua dest.

Desoxycholsäure, Taurodesoxycholsäure, Cholsäure und Glykocholsäure besitzen unter diesen Bedingungen nur eine 8o-92 %ige Hemmwirkung; Lezithin, Glykodesoxycholsäure und Taurocholsäure sogar nur eine 55-7o %ige Wirkung. Lithocholat ist bei diesen Konzentrationen gelartig und konnte in seiner Wirkung nicht beurteilt werden.
Bei geringeren Gallensäurekonzentrationen von 5o mmol/l im Ansatz verschiebt sich die Rangfolge der Wirkung ein wenig. Chenodesoxycholsäure und Taurochenodesoxycholsäure behalten eine ca. 8o %ige Hemmwirkung auf die Kristallisation. Lithocholat zeigt sich aber gleichwertig wirksam. Glykochenodesoxycholsäure und Taurodesoxycholsäure haben nur noch eine 65-7o %ige Wirkung, der Rest der Gallensäuren und Lezithin zeigen zwischen 2o-5o% Wirksamkeit. Auch bei noch geringeren Konzentrationen der Lösungsvermittler von 16,7 mmol/l führen Glykochenodesoxycholsäure, Taurochenodesoxycholsäure und Taurodesoxycholsäure zu 45-53 %iger Hemmung der Cholesterinkristallisation. Bei diesen geringen Konzentrationsbereichen haben die übrigen getesteten Gallensäuren Wirkungen zwischen 5-3o%, Lezithin um 35%.
Die Kristallisationshemmung durch die drei Chenodesoxycholsäuren und die Lithocholsäure entspricht einer 2-2,5-fachen Verbesserung der Löslichkeit von Cholesterin.

Bemerkenswert ist, daß die Lithocholate und Na-Cholanat oberhalb einer Konzentration von 15o mmol/l ein nicht flüssiges Gel bilden, das mikroskopisch erkennbare Strukturen aufweist (Dulce, H.J. 1975), aber als Lösungsvermittler nicht eingesetzt werden kann.

Tab. 3 Einfluß von Gallensäuresalzen und Lecithin auf die Cholesterinkristallisation in der Phase Alkohol/Wasser.

Art der Kristallisationshemmstoffe	Konzentration der wässrigen Lösungen der Hemmstoffe im Ansatz in mmol/l					
	3,3	16,7	33,3	50	66,6	83,3
Lecithin	1,12	0,76	0,64	0,57	0,5	0,45
Na-Cholanat	0,72	—	unlösliches Gel		—	—
Na-Lithocholat	1,09	1,00	0,84	0,27	unlösliches Gel	
Na-Taurolithocholat	1,24	1,00	0,96	unlösliches Gel		—
Na-Desoxycholat	0,92	0,91	0,82	0,57	0,42	0,20
Na-Glykodesoxycholat	1,20	1,14	1,01	0,92	0,64	0,34
Na-Taurodesoxycholat	0,89	0,64	0,57	0,36	0,23	0,09
Na-Chenodesoxycholat	1,02	0,84	0,73	0,24	0,13	0,03
Na-Glykochenodesoxycholat	0,89	0,56	0,46	0,41	0,25	0,00
Na-Taurochenodesoxycholat	1,00	0,55	0,44	0,23	0,17	0,03
Na-Cholat	1,20	1,05	0,85	0,71	0,36	0,25
Na-Glykocholat	1,04	0,82	0,71	0,57	0,39	0,11
Na-Taurocholat	0,94	0,9	0,77	0,65	0,62	0,52

Analysenwerte in mg Cholesterin. Maximale Cholesterinmenge im Ansatz 2 mg.
Kristallisation ohne Hemmstoffzusatz 1,17 $\pm$ 0,04 mg = Basiswert.
Mischung: 2 ml alkoholische Cholesterinlösung 2,6 mmol/l + 1ml wässriger Gallensäure-oder Lecithinlösung aus der Verdünnungsreihe.

Tab. 4 Einfluß von Gallensäuresalzen auf die Cholesterinkristallisation im System Alkohol/Wasser.

Art der Gallensäuren	Konzentration der Gallensäuren im Ansatz in mmol/l						
	3,3	16,7	33,3	50	66,6	83,3	150
Na-Lithocholat	1,94	1,70	1,46	1,15	unlösliches Gel		
Na-Taurolithocholat	1,95	1,73	1,62	unlösliches Gel			
Na-Glykodesoxycholat	1,67	1,58	1,44	1,41	1,12	0,89	0,12 mg
Na-Chenodesoxycholat	1,74	1,69	1,68	1,56	1,25	1,06	0,25 mg
Na-Glykochenodesoxycholat	1,81	1,67	1,58	1,53	1,22	1,02	0,18 mg
Na-Glykocholat	1,75	1,64	1,66	1,61	1,42	1,28	0,51 mg

Analysenwerte in mg Cholesterin. Maximale Cholesterinmenge im Ansatz 3 mg.
Cholesterinkonzentration im Ansatz 2,6 mmol/l.
Kristallisation ohne Zusatz $1{,}92 \pm 0{,}11$ mg = Basiswert.
Mischung: 2 ml 3,9 mmol/l alkoholische Cholesterinlösung + 1,0 ml Gallensäurelösung aus der Verdünnungsreihe.

In einem Grenzbereich der Konzentration wird dieses Gel schlagartig flüssig und hat dann eine deutlich hemmende Wirkung auf die Cholesterinkristallisation, wie sie auf Tabelle 3 und 4 zum Ausdruck kommt.
Um bei höheren Cholesterinkonzentrationen eine 87-95 %ige Hemmwirkung auf die Kristallisation von Cholesterin zu erreichen, muß die Gallensäurekonzentration auf 15o mmol/l erhöht werden. Dann sind wiederum die Chenodesoxycholsäuren maximal wirksam. Bei einer Gallensäurekonzentration von 83 mmol/l im Ansatz fanden wir nur 34-55 %ige Hemmwirkung. Bei 5o mmol/l Gallensäurekonzentration zeigte Na-Lithocholat eine deutliche Hemmwirkung von 4o%, wobei alle übrigen getesteten Gallensäuren nur zu 17-27% wirksam waren. Auch bei der höheren Cholesterinkonzentration entspricht die Wirkung der Chenodesoxycholsäuren in den oberen Konzentrationsbereichen einer 2 - 2,5-fachen Löslichkeitssteigerung von Cholesterin. Im mittleren Konzentrationsbereich von 5o mmol/l erhöht nur Lithocholat die Löslichkeit von Cholesterin auf das ca. 1,7-fache.

Tabelle 5 Cholesterinkristallisation im System Alkohol / Wasser in Gegenwart von 16,7 mmol/l Gallensäuresalzen im Ansatz

Cholesterin-Konzentration im Ansatz mmol/l	Na-Taurodesoxycholatzusatz	Na-Chenodesoxycholatzusatz	aqua dest.
o,87	o,1	o	o,38
1,74	o,54	o,92	1,17
2,61	1,46	1,56	1,92
3,48	2,24	2,5o	2,83
4,35	2,7o	3,1o	3,42
5,22	3,42	3,62	4,o8
6,92	5,18	5,3o	5,67
8,71	6,8	6,7o	7,28

Analysenwerte in mg Cholesterin pro Ansatz
Mischung: 2,o ml alkohol. Cholesterin aus Verdünnungsreihe
1,o ml Gallensäurelösung aus Verdünnungsreihe

Tabelle 5 zeigt den Einfluß von zwei wirksamen Gallensäuren auf die Kristallisation in einer Cholesterinverdünnungsreihe. Bei einer konstanten Konzentration von 16,7 mmol/l im Ansatz hält Taurodesoxycholsäure, unabhängig von der Cholesterinkonzentration, ca. o,5 - o,7 mg Cholesterin in Lösung, während Chenodesoxycholsäure nur ca. o,3 - o,5 mg in Lösung hält.

Weiterhin untersuchten wir den Einfluß von Lezithin auf die Kristallisation von Cholesterin in Gegenwart verschiedener Gallensäuren. Tabelle 6.

Es bestätigte sich die gute kristallisationshemmende Wirkung der Desoxycholsäuren und Chenodesoxycholsäuren, die auch in Gegenwart kleiner Lezithinmengen (1,66 mmol/l im Ansatz) deutlich wurde. Zusätzlich hatte hierbei Lithocholat, das in diesem Ansatz eine stark visköse Lösung darstellte und an der Grenze zum Gel lag, eine loo %ige kristallisationshemmende Wirkung auf Cholesterin.

Bei konstanter Gallensäurekonzentration und zunehmender Lezithinkonzentration zeigte sich allerdings, daß Lezithin die Lösungsvermittlerwirkung der Gallensäuren aufhebt und es bei hoher Lezithinkonzentration von 66,6 mmol/l im Ansatz sogar zu Überschreitungen des Basiswertes kommt. Das heißt, Lezithin fördert in diesen Konzentrationsbereichen in Gegenwart von äquimolaren Gallensäuremengen die Cholesterinkristallisation.

Tab. 6 Einfluß von Lecithin auf die Cholesterinkristallisation in Gegenwart von Gallensäuresalzen im Alkohol/Wasser System (Lecithinverdünnungsreihe)

Zugesetzte Gallensäurekonzentration im Ansatz = 66,6 mmol/l	Lecithin-Konzentration im Ansatz in mmol/l						
	1,7	3,3	8,3	16,7	33,3	50,0	66,6
Na-Lithocholat	0,0	-		unlösliches Gel			-
Na-Desoxycholat	0,04	0,11	0,13	0,24	0,40	0,69	0,96
Na-Glykodesoxycholat	0,03	0,08	0,13	0,20	0,32	0,50	0,76
Na-Taurodesoxycholat	0,09	0,11	0,17	0,26	0,35	0,53	0,74
Na-Chenodesoxycholat	0,19	0,3	0,46	0,72	0,87	0,99	1,11
Na-Taurochenodesoxycholat	0,07	0,19	0,51	0,77	0,94	1,08	1,1[illegible]
Na-Cholat	0,30	0,45	0,76	0,88	1,08	1,12	1,26
Na-Taurocholat	0,6	0,66	0,85	1,14	1,27	1,34	1,44

Analysenwerte in mg Cholesterin. Maximale Cholesterinmenge im Ansatz = 2 mg = 1,7 mmol/l. Kristallisation ohne Zusätze 1,17 $\pm$ 0,04 mg = Basiswert.

Mischung: 2,0 ml alkoholische Cholesterinlösung 2,6 mmol/l.
1,0 ml Gallensäure-Lecithingemisch, bestehend aus
0,5 ml Gallensäuresalzlösung 400 mmol/l.
0,5 ml Lecithinverdünnungsreihe 10 - 400 mmol/l.

Bei höheren Lezithinkonzentrationen treten grundsätzlich Lithocholatgele auf, weshalb keine Wirkung im Fällungsmodell ablesbar ist.

Prüft man den Einfluß von äquimolaren Lezithin- und Gallensäuremengen in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe auf die Cholesterinkristallisation, dann wird die Lösungsvermittlerwirkung der Gallensäuren vollständig überlagert durch die die Cholesterinkristallisation induzierende Wirkung des Lezithins (Tabelle 7).

Die Kristallisation von Cholesterin wird bis auf 15o% des Leerwertes verstärkt im Bereich der Lezithin-Gallensäurekonzentration im Ansatz von 41,5 mmol/l. Die Kristallisation bei 1,7 mmol/l Zusatz entspricht bereits durchweg dem Basiswert ohne Zusätze. Ein nennenswerter Wirkungsunterschied einzelner Gallensäuren ist bei diesen Versuchen nicht mehr erkennbar. Das Lithocholat-Lezithingemisch erreicht noch die relativ niedrigsten Werte der Cholesterinfällung.

Untersucht man den Einfluß von einer aufsteigenden Gallensäureverdünnungsreihe auf die Cholesterinkonzentration bei einer konstanten, geringen Lezithinkonzentration von 1,7 mmol/l, dann tritt die kristallisationshemmende Wirkung der Gallensäuren wieder deutlich hervor (Tabelle 8).

Tab. 7 Einfluß eines Lecithin-Gallensäuregemisches (äquimolar 1/1) auf die Cholesterinkristallisation im System Alkohol/Wasser.

Art der Zusätze Molverhältnis 1:1	Konzentration der Zusätze im Ansatz in mmol/l 1,7	8,3	16,6	24,9	33,3	41,5
Lecithin-Na-Lithocholat	1,11	1,12	1,26	1,34	1,44	unlösliches Gel
Lecithin-Na-Desoxycholat	1,24	1,30	1,31	1,53	1,56	1,60
Lecithin-Na-Glykodesoxycholat	1,25	1,27	1,39	1,52	1,53	1,60
Lecithin-Na-Taurodesoxycholat	1,14	1,23	1,31	1,40	1,46	1,51
Lecithin-Na-Chenodesoxycholat	1,21	1,34	1,39	1,42	1,46	1,49
Lecithin-Na-Glykochenodesoxycholat	1,19	1,30	1,46	1,49	1,49	1,56
Lecithin-Na-Taurochenodesoxycholat	1,35	1,43	1,48	1,59	1,63	1,74
Lecithin-Na-Cholat	1,21	1,26	1,42	1,42	1,51	1,56
Lecithin-Na-Glykocholat	1,16	1,19	1,30	1,38	1,43	1,58
Lecithin-Na-Taurocholat	1,20	1,26	1,48	1,57	1,71	1,78

Analysenwerte in mg Cholesterin. Maximale Cholesterinmenge im Ansatz = 2 mg = 1,7 mmol/l. Kristallisation ohne Zusätze 1,17 ± 0,04 mg = Basiswert.

Mischung: 2 ml alkoholische Cholesterinlösung (2,6 mmol/l) + 1 ml wässrige Lösungsvermittler. 1 ml Lösungsvermittlergemisch, bestehend aus 0,5 ml Lecithinlösung, Verdünnungsreihe 10-250 mmol/l. 0,5 ml Gallensäuresalzlösung, Verdünnungsreihe 10-250 mmol/l.

Tab. 8 Einfluß eines Lecithin-Gallensäuregemisches auf die Cholesterinkristallisation im System Alkohol/Wasser. Gallensäureverdünnungsreihe.

Art der Zusätze. Lecithinkonzentration in allen Ansätzen 1,7 mmol/l	Konzentration der Gallensäure im Ansatz mmol/l					
	3,3	16,7	33,3	50,0	66,6	83,3
Lecithin-Na-Lithocholat	1,03	0,64	0,12	0,07	unlösliches Gel	
Lecithin-Na-Desoxycholat	1,04	0,96	0,88	0,44	0,36	0,17
Lecithin-Na-Glykodesoxycholat	1,16	0,93	0,78	0,34	0,21	0,03
Lecithin-Na-Taurodesoxycholat	1,06	0,98	0,79	0,30	0,13	0,00
Lecithin-Na-Chenodesoxycholat	1,06	0,97	0,69	0,29	0,09	0,01
Lecithin-Na-Glykochenodesoxycholat	1,11	1,04	0,78	0,60	0,30	0,22
Lecithin-Na-Taurochenodesoxycholat	1,20	1,13	0,98	0,62	0,46	0,15
Lecithin-Na-Cholat	1,10	1,02	0,95	0,85	0,54	0,18
Lecithin-Na-Glykocholat	1,01	0,83	0,68	0,57	0,47	0,38
Lecithin-Na-Taurocholat	1,13	1,07	0,92	0,75	0,55	0,42

Analysenwerte in mg Cholesterin. Maximale Cholesterinmenge im Ansatz = 2 mg = 1,7 mmol/l. Kristallisation ohne Zusätze = 1,17 $\pm$ 0,04 mg = Basiswert.

Mischung: 2 ml alkoholische Cholesterinlösung 2,6 mmol/l
1 ml Lösungsvermittlergemisch bestehend aus
0,5 ml Lecithinlösung 10 mmol/l
0,5 ml Gallensäuresalzlösung. Verdünnungsreihe 20-500 mmol/l.

Bei 16,7 mmol/l Gallensäurezusätzen finden wir für die Lithocholsäure eine 45 %ige kristallisationshemmende Wirkung, während die anderen Gallensäuren nur 5-3o% Wirksamkeit zeigen.
Bei Gallensäurezusätzen von 5o mmol/l im Ansatz hemmt die Lithocholsäure die Cholesterinkristallisation zu 94%, alle Desoxycholsäuren und Chenodesoxycholsäure zu 63-75%, während alle Cholsäuren und die Glyko- und Taurochenodesoxycholsäuren in Gegenwart von Lezithin nur Einflüsse von 23-46% auf die Kristallisation haben.

Bei Gallensäurekonzentrationen von 83 mmol/l im Ansatz ist wegen der Gelbildung Lithocholat nicht zu beurteilen. Chenodesoxycholsäure, Glyko- und Taurodesoxycholsäure hemmen aber die Kristallisation von Cholesterin zu 97 - loo%. Auch die übrigen Gallensäuren haben Einflüsse zwischen 64 - 87%. Lithocholat steigert damit in Gegenwart von etwas Lezithin, im Bereich um 5o mmol/l, die Cholesterinlöslichkeit um das 2,5-fache, was durch Chenodesoxycholsäure und andere Desoxycholsäuren erst durch Konzentrationen von 83 mmol/l erreicht wird.

Führt man die gleichen Untersuchungen mit höheren Cholesterinkonzentrationen im Ansatz durch, dann bestätigt sich die gute kristallisationshemmende Wirkung des Lithocholates (Tabelle 9).

Tab. 9 Einfluß eines Lecithin-Gallensäuregemisches auf die Cholesterinkristallisation im System Alkohol/Wasser.

Art der Zusätze. Lecithinkonzentration in allen Ansätzen 1,7 mmol/l	Gallensäure-Konzentration im Ansatz in mmol/l						
	3,3	16,7	33,3	50	66,6	83,3	150
Na-Lithocholat + Lecithin	1,97	1,69	1,53	1,27	0,40	unlösliches Gel	
Na-Chenodesoxycholat + Lecithin	1,92	1,68	1,52	1,26	1,0	0,81	0,31
Na-Taurodesoxycholat + Lecithin	2,01	1,94	1,86	1,61	1,45	1,05	0,32
Na-Taurocholat + Lecithin	1,92	1,89	1,77	1,75	1,55	1,41	0,78

Analysenwerte in mg Cholesterin, maximale Cholesterinmenge im Ansatz 3 mg = 2,6 mmol/l. Kristallisation ohne Zusätze = 1,92 mg $\pm$ 0,11 = Basiswert.

Mischung: 2 ml alkoholische Cholesterinlösung (3,9 mmol/l)
1,0 ml Lösungsvermittlergemisch bestehend aus
0,5 ml Lecithinlösung 10 mmol/l
0,5 ml Gallensäuresalzlösung. Verdünnungsreihe 20-900 mmol/l.

Schon bei geringen Konzentrationen von 16,7 mmol/l findet man eine 13 %ige Hemmwirkung für Lithocholsäure und Chenodesoxycholsäure. Diese Wirkung nimmt bei 5o mmol/l im Ansatz auf 35% zu, und bei 66,6 mmol/l im Ansatz beträgt sie für die Lithocholsäure 79% und die Chenodesoxycholsäure 48%. Bei 15o mmol/l im Ansatz versagt die Beobachtung von Lithocholat wegen der Gelbildung. Chenodesoxycholsäure und Taurodesoxycholsäure wirken aber zu ca. 84% auf die Cholesterinfällung hemmend. Lithocholat, Chenodesoxycholat und Taurodesoxycholat erhöhen damit die Cholesterinlöslichkeit auch bei höheren Cholesterinkonzentrationen um das 2,4 - 2,5-fache, wenn nur mehr Gallensäure zugesetzt wird.

IV. Diskussion

Das von uns entwickelte Fällungsmodell für Cholesterin steht dem Lösungsmodell früherer Autoren (Hegardt und Dam, 197o) gegenüber. Die Kristallisation entspricht mehr dem Vorgang der Steinbildung, die Auflösung mehr dem Vorgang der Steinlösung. Beide Vorgänge müßen in vitro nicht quantitativ zu gleichen Resultaten führen, weil die Kristallisation das Phänomen der Übersättigung der Lösung voraussetzt, und die Auflösung in der Regel nur zur Sättigung führt. Deshalb ist zu erwarten, daß Lösungsvermittler auch unterschiedliche qualitative und quantitative Einflüsse auf diese Vorgänge ausüben, je nachdem ob die Stoffe physikalisch-chemisch eine Übersättigung stabilisieren oder eine echte lösliche Verbindung mit der kristallisierten Substanz bilden.

Zur Aufklärung der Cholesterinsteinbildung scheint das Fällungsmodell empfehlenswerter. Wir haben uns bemüht, soweit möglich, physiologische Konzentrationen, wie sie im Gallensaft vorkommen, einzusetzen. Tabelle lo. stellt die von uns verwendeten Konzentrationen gegenüber. Unphysiologisch an unserem Modell ist das zweiphasige System Alkohol/Wasser. Auf andere Art konnten wir aber Cholesterin nicht ohne pH-Verschiebung in nahezu physiologischen Mengen in Lösung bringen. Die Löslichkeitsstudien von HEGARDT und DAM führen wahrscheinlich zu unphysiologisch geringen gelösten Cholesterinmengen, wie sie im Gallensaft nicht vorkommen.

Tabelle 1o

	Mensch[+] Konzentrationen		von uns verwendete Konzentrationen
	Lebergalle	Blasengalle	im in vitro Modell
Cholesterin	2 - 5 mmol/l	11 - 23 mmol/l	1,7 - 2,6 mmol/l
Gallensäure	16 - 33 mmol/l	1oo - 273 mmol/l	1,7 - 15o mmol/l
Lezithin	1,3 - 7,7 mmol/l	1o - 46 mmol/l	1,7 - 83,3 mmol/l
Protein	1,4 - 2,7 g/l	4,5 g/l	

[+] (Rauen, H.W., 1964)

Hinsichtlich der Lezithinkonzentration im Gallensaft ist zu bemerken, daß sie wahrscheinlich in der Literatur (Brühl, W. 1972) zu hoch angegeben wird, weil die meisten Analysenwerte durch Umrechnung vom Gesamt-P im Gallensaft auf Lezithin zustandekommen. GREIF und DULCE (1975) konnten aber feststellen, daß ca. 2/3 des Phosphors im Gallensaft zu organischem Phosphat gehören. Konzentrationen in der Blasengalle für Lezithin von 1o mmol/l sind deshalb wahrscheinlicher als die von 46 mmol/l. Unter diesem Aspekt sind auch unsere Fällungsmodelle zu betrachten.

Die Untersuchungen mit unserem Fällungsmodell ergaben, daß bei Cholesterinkonzentrationen zwischen 1,7 und 2,6 mmol/l alle drei Chenodesoxycholsäuren in Konzentrationen zwischen 66 und 15o mmol/l sehr gute kristallisationshemmende Wirkungen zeigten, während Lezithin, die Desoxycholsäuren und die Trihydroxycholansäuren nur mäßig wirksam waren. Lithocholate waren bei Grenzkonzentrationen zum festen Gel von 5o mmol/l ebenfalls sehr gute Kristallisationshemmstoffe für Cholesterin. Lezithin ist in Gegenwart von Gallensäuren kein Kristallisationshemmstoff für Cholesterin, es fördert vielmehr die Kristallisation.
In Gegenwart einer geringeren Lezithinkonzentration wirkt Lithocholat bis zu Grenzkonzentrationen zum Gel von 5o bzw. 66 mmol/l als ausgezeichneter, teilweise loo %iger Kristallisationshemmstoff für Cholesterin, der die übersättigte Lösung stabilisiert und eine ca. 2,5-fache, bessere Löslichkeit des Cholesterins bewirkt.

Chenodesoxycholsäure und die drei Desoxycholsäuren sind in Anwesenheit von Lezithin weitere wirksame Hemmstoffe. Diese Befunde mit der Kombination von Gallensäure und Lezithin haben Aussagekraft für die physiologischen Verhältnisse im Gallensaft der immer Lezithin und Gallensäure enthält. Lithocholsäure war bisher von anderen Autoren noch nicht in vitro-Prüfungen unterzogen worden. Wir wissen aber, daß Lithocholate neben Desoxycholaten und Chenodesoxycholaten sowie Cholaten im Gallensaft vorkommen.

Unsere Ergebnisse widersprechen den in vitro Befunden von HEGARDT und DAM (197o) sowie NEIDERHISER und ROTH (1968) mit dem Lösungsmodell, wonach Glykodesoxycholsäure ohne Lezithinzusatz die Cholesterinlöslichkeit am stärksten beeinflußt.

Sie widersprechen weiterhin den Folgerungen aus Befunden, daß Lezithin in Gegenwart von Gallensäuren ein biologischer Lösungsvermittler für Cholesterin ist (Neiderhiser und Roth, 1968). Unsere Ergebnisse stimmen vielmehr mit den Befunden von HIGUCHI (1972) mit dem Lösungsmodell überein. Nach unseren Beobachtungen müßen wir Löslichkeitsquotienten für Cholesterin, wie sie ADMIRAND und SMALL (1968) als $\frac{\text{Gallensäure + Lezithin}}{\text{Cholesterin}}$ angeben und Löslichkeitsdiagramme wie Abb. 4, denen das gleichgerichtete Verhalten von Gallensäuren und Lezithin zugrunde liegt, als irreführend betrachten.

Die Lithogenität der Galle kann aus diesen Quotienten und Diagrammen nicht richtig beurteilt werden.
Wir würden aus unseren Befunden ableiten, daß die Kristallisation von Cholesterin im Gallensaft hauptsächlich vom Verhältnis Cholesterinkonzentration zu Gallensäurekonzentration abhängt. Der Lithocholsäure könnte hierbei, ebenso wie den Chenodesoxycholsäuren und Desoxycholsäuren, eine besondere Bedeutung zukommen, weil Mono- und Dihydroxycholansäuren im neutralen pH-Bereich höher molekulare Mizellen bilden (Small u.M. 1969), die möglicherweise übersättigte Cholesterinlösungen stabilisieren, weil sie die Kristallflächen der Einheitszellen besetzen und ein epitaktisches Wachstum behindern. Die anfangs viskösen Lithocholatgele zeigen die mizellaren Überstrukturen am deutlichsten (Dulce, H.J. 1975), und sind der beste Kristallisationshemmstoff in bestimmten Konzentrationsbereichen.
Man könnte annehmen, daß die aus Lezithin und Gallensäuren gebildeten Mizellen (Small u.M. 1966, 1966a) ein schlechter Kristallisationshemmstoff sind, weil ihr hydrophiler Charakter geringer wird. Ob stereochemische Verhältnisse der OH-Gruppen am Steranring Einfluß auf die Mizellenbildung haben, ist bisher nicht erkennbar.

Wenn physiologischerweise Lithocholate, Chenodesoxycholate und Desoxycholate im Gallensaft vorrangig die Kristallisation von Cholesterin hemmen und seine Löslichkeit bis zum 2,5-fachen steigern, dann erscheint es gerechtfertigt, zur Auflösung von Gallensteinen diese Gallensäuren im Gallensaft in vivo erhöhen zu wollen.

Die gewissen Erfolge mit der Chenodesoxycholsäure-therapie könnten auch darin begründet sein, daß reduktiv im Darm vermehrt Lithocholsäure gebildet wird, die über den enterohepatischen Kreislauf ebenso wie Chenodesoxycholsäure als weniger toxische Konjugate vermehrt im Gallensaft erscheint. Um diese biologischen Veränderungen in vivo besser zu erkennen, sind differenzierte quantitative Bestimmungen der einzelnen Gallensäuren und Komponenten in der Galle von Gesunden und Kranken erforderlich. Die bisherigen gaschromatographischen Analysen sind noch zu unsicher, um verbindliche Schlüsse zu ziehen.

V. Zusammenfassung

Wir entwickeln ein Fällungsmodell im System Alkohol/ Wasser, um die Einflüsse von Gallensäuren und Lezithin im Bereich physiologischer Konzentration auf die Kristallisationsbereitschaft von Cholesterin zu untersuchen.

Wir finden eine fast loo %ige kristallisationshemmende Wirkung auf Cholesterin bei den drei Chenodesoxycholaten und eine ebenso gute Wirkung des Lithocholates im Grenzbereich zum Gel. Damit wird die Löslichkeit des Cholesterins auf das 2 - 2,5-fache gesteigert. Lezithin wirkt ebenso wie andere Gallensäuren schwächer.
In Kombination mit Gallensäuren verhält sich Lezithin nicht als Kristallisationshemmstoff des Cholesterins, sondern induziert eher die Kristallisation.

In Gegenwart von kleineren Lezithinkonzentrationen hat Lithocholat über weite Bereiche eine bessere, bis nahezu loo %ige, kristallisationshemmende Wirkung auf Cholesterin als Chenodesoxycholat und die drei Desoxycholate.

Wir halten eine Beurteilung der Lithogenität des Gallensaftes nach Quotienten und Diagrammen, die aufgrund der gleichgerichteten Wirkung von Lezithin und Gallensäure entworfen sind, für falsch.

Mono- und Dihydroxygallensäuren wirken wahrscheinlich deshalb so gut als Kristallisationshemmstoffe, weil sie im neutralen Bereich höher molekulare Mizellen bilden, die übersättigte Cholesterinlösungen stabilisieren. Visköse Lithocholate sind hierbei wirksamer als Chenodesoxy- und Desoxycholate. Lezithin behindert anscheinend die Eigenschaften dieser Mizellen.

Lithocholate könnten eine Wirkungskomponente der Chenodesoxycholsäuretherapie sein, weil sie dabei im enterohepatischen Kreislauf vermehrt gebildet werden.

Wenn es gelänge, die Toxizität der Lithocholsäure vonvornherein durch chemische Umwandlungen unter Beibehaltung ihrer guten Wirkung als Kristallisationshemmstoff so weit zu reduzieren, daß eine Gefährdung des menschlichen Organismus ausgeschlossen ist, wäre sie unserer Ansicht nach ein erfolgversprechendes Mittel zur Cholesterinsteinauflösung und Prophylaxe.

Literatur

Admirand, W.H., Small, D.M.: The physicochemical basis of Cholesterol gallstone formation in man . J. Clin. Invest. 47, 1043 (1968).

Bell, G.D., Whitney, B., Dowling, R.H.: Gallstone dissolution in man usingchenodesoxycholic acid. Lancet 9, 1213 (1972).

Bourges, M., Small, D.M., Dervichian, D.G.: Biophysics of lipidic associations. III. The quarternary systems Lecithin-bile salt-cholesterol-water. Biochem.Biophys. Acta 144, 189 (1967).

Bourges, M., Small, D.M., Dervichian, D.J.: Biophysics of lipid associations. II. The ternary systems cholesterol-Lecithin-water. Biochem.Biophys.Acta 137, 157 (1967 a).

Brühl, W.: Ursachen der Gallensteinbildung. Schweiz.med.Wschr. 102, 1766 (1972).

Caldwell, F.T., Jr and Levitsky, K.: Gallbladder and gallstone formation. Ann.Surg. 166, 753 (1967).

Dam, H., Christensen, F.: Alimentary production of gallstones in hamsters. 10. The effect of orally ingested bile aerols on development of cholesterol gallstones in hamsters. Z. Ernährungswiss. 2, 154 (1962).

Dam, H.: World review of Nutritian and Dietetics. Verlag Karger, Basel, 11, 199 (1969).

Danziger, R.G., Hofmann, A.F., Schoenfield, L.J., Thistle, G.L.: Dissolution of cholesterol gallstones by chenodesoxycholic acid. New Engl. J. Med. 286, 1 (1972).

Dowling, R.H., Small, D.M.: Effect of controlled interruptions of enterohepatic circulation on composition of bile in rhesus monkey. J. Clin. Invest. 47, 26A (1968).

Dulce, H.J.: Persönliche Mitteilung unveröffentlichter Untersuchungen 1975.

Fitzner, R.: Persönliche Mitteilung unveröffentlichter Untersuchungen 1976.

Flügel, H.: Auflösung von Gallensteinen mit Chenodesoxycholsäure. Fortschr. Med. 92, 272 (1974).

Greif, S.: Persönliche Mitteilung unveröffentlichter Untersuchungen 1975.

Hegardt, F.G., Dam, H.: The solubility of Cholesterol in aqueous solutions of bile salts and Lecithin. Ztschr. f. Ernährungswiss. 10,223 (1970).

Higuchi, W.J., Prakongpan, S., Surpuriya, V., Young, F.: Cholesterol dissolution rate in micellar bile acid solutions: Retarding effect of added Lecithin. Science 178, 633 (1972).

Neiderhiser, D.H. and Roth, H.P.: Cholesterol solubilization by solutions of bile salts and bile salts plus Lecithin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128, 221 (1968).

Rauen, H.W.: Biochemische Taschenbuch II. Teil. Verlag: J. Springer Berlin-Göttingen- Heidelberg 1964.

Röschlau, P., Bernt, E. and Gruber W.: Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum. Ztschr. Klin.Chemie u. Klin.Biochem. 12,226 (1974).

Saunders, D.R. and Wells, U.A.: Biochim.Biophys.Acta. 176, 828 (1969).

Schoenfield, L.J., Bonorris, G.G. and Ganz, P.: Induced alterations in the rate limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the hamster. J.Lab.Clin. Med. 82, 858 (1973).

Shioda, R.: Experimental studies on gallstone formation. Archiv J. Jap.Chir. 34, 1160 (1965).

Small, D.M., Bourges, M. and Dervichian, D.G.: Ternary and quaterny aqueous systems containing bile salt, Lecithin and cholesterol. Nature 211, 816 (1966).

Small, D.M., Bourges, M. and Dervichian, D.G.: Biophysics of lipidic associations. I. The ternary systems Lecithin-bile salt-water. Biochem.Biophys. Acta 125, 563 (1966 a).

Small, D.M.: Gallstones. New Engl.J.Med. 279, 588 (1968).

Small, D.M. in Schiff, L., Carey, J.B., Dietschy, J.M.: Bile salt metabolism. Charles, C. Thomas Publisher Springfield Illinois,(1969 a) p. 223.

Small, D.M., Penkett, S.A. and Chapman, D.: Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroskopy. Biochem.Biophys.Acta. 176, 178, (1969).

Small, D.M.: Studies on the size and structure of bile salt micelles. Advan.Chem.Ser. 84, 31 (1968 a).

Small, D.M., Shaffer, E.A., Braasch, J.W. in Back, P., Gerok,W. Bile Acids in Human diseases. Verlag: F.K. Schattauer, Stuttgart, New York, 1972, p. 175.

Smallwood, R.A., Jablonski, P. and Watts, J.M.: Intermittent secretion of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. Brit.Med.J. 4,263 (1972)

Thistle, J.L. and Hofmann, A.F.: Therapeutic efficacy and safety of chenodesoxycholic acid for cholesterol gallstones. Gastroenterology 64, 809 (1973).

Tanimura, H.: Experimental studies on etiology of cholelithiasis. Arch.J.Jap.Chir. 34, 1160 (1965).

Thureborn, E.: Human hepatic bile. Acta Chir.Scand.(Supp.) 303 (1962).

Wolpers, C.: Spontanauflösung von Gallenblasensteinen. Dtsch.-med.Wschr. 93, 2525 (1968).

L e b e n s l a u f

Am 18. Januar 1944 wurde ich als Sohn des Kriminalkommissar Helmut Gramsdorff und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Strache, in Grünheide/Mark Kreis Niederbarnim geboren. Nach Einmarsch der Russen flüchteten meine Eltern mit meinen beiden Geschwistern und mir zunächst nach Dannenberg/Elbe und siedelten dann nach Bönningstedt/Holstein über. 1955 verzogen wir nach Berlin. Hier legte ich 1963 an der Herderschule, Oberschule des Wissenschaftlichen Zweiges, die Reifeprüfung ab und begann im September 1963 mit dem Studium der Humanmedizin. Im Februar 1971 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Seit 1972 bin ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Rittberg-Krankenhauses in Berlin-Lichterfelde tätig und befinde mich zur Zeit im fünften Jahr meiner chirurgischen Facharztausbildung.

Ich bin seit August 1971 mit der Fremdsprachenkorrespondentin Heidi Gramsdorff, geb. Gollnik, verheiratet.
1973 wurde unsere Tochter geboren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.J. Dulce, dem ich die Anregung zu dieser Dissertation verdanke.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198